Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 3, Fall 2023, p. 229-236

Investigation of Fungi Causing and Associated with Narcissus Leaf Spot Disease in Southern Khorasan Province

S. Motavalli Habibi[1], M. Jahani[2*], H. Mahmoudi[3], M.R. Mirzaee[4]

Received: 23-05-2022
Revised: 28-08-2023
Accepted: 01-10-2023
Available Online: 01-10-2023

How to cite this article:
Motavalli Habibi, S., Jahani, M., Mahmoudi, H., & Mirzaee, R. (2023). Investigation of fungi causing and associated with Narcissus leaf spot disease in Southern Khorasan province. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *37*(3), 229-236. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2023.76784.1094

Introduction

Narcissus (*Narcissus tazetta*) is one of the perennial herbaceous and ornamental bulbous crops that is used as a cut flower garden plant and potted plant. Fungal diseases are one of the harmful factors of this ornamental plant in different parts of the world. In 2018, symptoms of Narcissus leaf spot (NLS) were observed in some planting areas of this plant in South Khorasan province. This study was carried out to identify the casual and associated fungi with NLS in Southern Khorasan province.

Materials and Methods

Samples with leaf spot symptoms were collected from two regions, Khoosf and Tabas, from 2018 to 2019. Plant tissues were transferred to the laboratory of the Department of Plant Protection in separate paper bags. The tissues were cultured on a Potato Dextrose Agar (PDA) medium and purification was performed on a 2% water-agar medium using the Hyphal tip method. Fungal agents were isolated and identified based on morphological and molecular characteristics. The DNA of representative fungal isolates was extracted according to the CTAB method. To molecularly confirm the species, part of the rDNA gene was amplified using ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primers. Sequencing of PCR products was done by Pishgam Biotechnology Company and deposited in the GenBank with Accession number: MN829259. Sequences were edited with Chromas software and the edited sequences were saved in FASTA format. The ITS-based phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood Method with MEGA ver6.0 software. For the pathogenicity test, the Narcissus plant was inoculated with mycelia plugs. In order to maintain moisture and establish the fungus, the inoculation area was covered with parafilm. The plants were covered with polythene bags for 24 hours. The bags were removed after 24 hours. In the control plants, the potato-dextrose-agar culture medium without fungal mycelium was used. All plants were examined after 3 to 14 days and the pathogen was re-isolated from the inoculated plant that showed leaf spot.

Results and Discussion

Symptoms of narcissus leaf spot (NLS) disease in the sampled areas included elongated, elliptical, and red to brown circles on the leaf. A total of 50 samples of different leaf spot symptoms were collected. In this study, 20 fungal strains were isolated and identified based on morphological and molecular characteristics. The growth

1 and 2- M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mjahani@birjand.ac.ir)
3 and 4- Researcher and Assistant Professor of Plant Protection Research Section of Agricultural and Natural Research and Education Center of South Khorasan Province, Birjand, Iran, respectively.
https://doi.org/10.22067/jpp.2023.76784.1094

rate of this isolate on the PDA medium was relatively fast and the average growth rate after 7 days was 6.6 cm. Pycnidia were formed abundantly on the PDA medium after 7 days. The pycnidiospores were transparent, mostly single-celled (3-4×5-7), sometimes two-celled (11.5-15 ×5.8), round to oval and curved. Chlamydospores (8-15) were dark brown, unicellular and multicellular, intercellular and rarely terminal. Based on morphological characteristics, the strains were finally identified as *Phoma narcissi*.

The NCBI blast search revealed that the ITS region *Phoma narcissi* in our study had similarities to *Didymella curtisii*, *Phoma narcissi*, and *Phoma* sp. 100%, 100%, and 99% respectively. Phylogenetic analysis confirms that the examined strain belongs in a clade with strains of *Ph. narcissi*. In Pathogenicity tests, symptoms of the disease were observed on all plants 7 days after inoculation. No symptoms developed on non- inoculated plants. The original pathogen was re-isolated from the leaf spots of inoculated plants. *Phoma s.l*. is one of the most ubiquitous fungal genera, characterized by its great ecological diversity and difficult identification. According to our knowledge, the main cause of NLS disease in the east of the country is the *Ph. Narcissi*, *Fusarium* sp. and *Cladosporium* sp. were associated agents with this disease. Since the identification of the disease agent is effective in choosing effective and efficient strategies for disease control, the results can help to adopt effective methods in disease management.

Keywords: Narcissus, Pathogenic fungus, *Phoma narcissi*

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله کوتاه پژوهشی
جلد ۳۷ شماره ۳، پاییز ۱٤۰۲، ص. ۲۳٦-۲۲۹

بررسی قارچ‌های عامل و همراه بیماری لکه‌برگی گیاه گل نرگس در استان خراسان جنوبی

سعیده متولی حبیبی[۱]- مهدی جهانی[۲*]- هادی محمودی[۳]- محمدرضا میرزائی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۹

چکیده

گل نرگس گیاهی چندساله و زینتی از تیره آماریلیداسه است که استفاده آن به صورت گل بریده، گیاه باغچه‌ای و گلدانی در کشور رایج می‌باشد. بیماری‌های قارچی یکی از عوامل خسارت‌زای این گیاه زینتی در نقاط مختلف جهان محسوب می‌شوند. این مطالعه به منظور شناسایی قارچهای عامل و همراه بیماری لکه برگی گل نرگس در استان خراسان جنوبی طی سال‌های زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۷ انجام گرفت. نمونه‌های دارای علایم بیماری از دو منطقه در استان (شهرستان‌های خوسف و طبس) جمع‌آوری، عوامل قارچی جداسازی و بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی شناسایی انجام شد. جهت تایید مولکولی گونه، تکثیر بخشی از ژن rDNA با آغازگر ITS4 و ITS5 انجام شد. بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی عامل اصلی بیماری لکه برگی در استان خراسان جنوبی گونه *Phoma narcissi* شناسایی و بیماری‌زایی آن اثبات شد. بلاست توالی ناحیه تکثیر شده نشان داد که توالی مربوط به جدایه *Phoma narcissi* در این مطالعه با جدایه‌های (heterotypic synonym*: Phoma narcissi*) *Didymella curtisii*، *Phoma narcissi* و *Phoma* sp. در بانک ژن به‌ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰ و ۹۹ درصد شباهت دارد. در این بررسی آرایه‌های قارچی از جنس‌های *Fusarium*، *Cladosporium* نیز به عنوان عوامل همراه این بیمارگر شناسایی و گزارش می‌شود. از آنجایی که شناسایی عامل بیماری در انتخاب روش‌های موثر و کارآمد در مدیریت بیماری موثر است، نتایج این بررسی می‌تواند به اتخاذ روش‌های موثر در مدیریت بیماری کمک نماید.

واژه‌های کلیدی: قارچ بیمارگر، گل نرگس، *Phoma narcissi*

مقدمه

نرگس با نام علمی *Narcissus tazetta* از تیره Amaryllidaceae گیاهی چندساله و جزء محصولات پیازدار زینتی محسوب می‌شود. ۳۲ هکتار از اراضی استان خراسان جنوبی زیر کشت گل نرگس بوده و بیشترین سطح زیر کشت در استان به‌ترتیب مربوط به شهرستان خوسف با سطح ۲۱ هکتار و طبس با سطح ۱۱ هکتار است (Agricultural jihad of southern Khorasan, 2019). یکی از عوامل مهم در کاهش کمی و کیفی گل نرگس بیماری‌های قارچی است. بیماری‌های قارچی ناشی از *Fusarium* oxysporum f.sp. *narcissi*، *Botrytis narcissicola*، *Ramularia vallisumbrosae*، *Botryotinia polyblastis*، *Stagonospora curtissi* و *Physoderma narcissi* از جمله بیماری‌های مهم نرگس در مناطق مختلف جهان می‌باشند (Taylor *et al.*, 2019; Hanks and Chastagner). در ایران گونه *Stagonospora curtisii*، بر اساس خصوصیات مرفولوژیک به‌عنوان عامل لکه برگی از مزارع نرگس بهبهان گزارش شده است (Mohammadi *et al.*, 2004). در سال ۱۳۹۷ علایم لکه برگی در مزارع گل نرگس در برخی از مناطق کاشت این گیاه در استان خراسان جنوبی مشاهده شد. از آنجایی که شناسایی عامل بیماری

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
(*- نویسنده مسئول: Email: mjahani@birjand.ac.ir)
۳ و ۴- به‌ترتیب پژوهشگر و استادیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان جنوبی بیرجند-ایران
https://doi.org/10.22067/jpp.2023.76784.1094

اولین مرحله در مدیریت بیماری است در این پژوهش، سبب‌شناسی عامل بیماری لکه برگی در مناطق کاشت گل نرگس در استان خراسان جنوبی انجام گرفت. نتایج این بررسی می‌تواند در تدوین دستورالعمل مدیریت بیماری حائز اهمیت باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی عوامل بیمارگر

نمونه‌برداری در سال‌های ۹۹–۹۷ در دو منطقه خوسف و طبس در استان خراسان جنوبی انجام گرفت. برای جداسازی عامل بیماری، از برگ‌های دارای علائم لکه برگی، بخش کوچک حدفاصل بخش آلوده و سالم جدا و به مدت ۵ دقیقه زیر جریان ملایم شیر آب شست و سپس از حدفاصل بافت سالم و آلوده قطعات ۱سانتی‌متری برش داده شد. نمونه‌ها در محلول نیم درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی سطحی و پس از شستشو با آب مقطر سترون روی سیب زمینی–دکستروز–آگار کشت داده شد. برای شناسایی مولکولی ناحیه ژنی ITS[1] با استفاده از آغازگرهای ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) و ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) تکثیر شد و درخت فیلوژنی مبتنی بر توالی این ناحیه با استفاده از روش بیشینه درست نمایی[2] با نرم‌افزار MEGA ver6.0 ترسیم شد (Tamura *et al.*, 2013).

برای انجام آزمون اثبات بیماری‌زایی، قطعات ۱×۱ سانتی‌متری از محیط کشت دارای میسلیوم جدایه‌های قارچی روی برگ‌های گل نرگس که با الکل سفید سترون شده بود، قرار داده شد. به‌منظور حفظ رطوبت و استقرار قارچ ناحیه تلقیح با پارافیلم پوشیده شد. بوته‌ها با نایلون پلاستیکی به مدت ۴۸ ساعت پوشانده و هر روز سطح داخلی پلاستیک با آب اسپری شد تا رطوبت مورد نیاز حفظ شود. در مورد گیاهان شاهد از محیط کشت سیب زمینی–دکستروز–آگار بدون پرگنه قارچی استفاده شد. انجام آزمایشات بیماری‌زایی درون گلدان و همچنین در شرایط مزرعه (در پلات‌های آزمایشگاهی مزرعه‌ای) انجام شد. بوته‌ها بعد از گذشت ۳ تا ۱۴ روز بررسی و از گیاهانی که علائم در آن‌ها مشاهده شد، قارچ عامل بیماری مجدد جداسازی گردید.

نتایج و بحث

در نمونه‌برداری از دو منطقه عمده کاشت گل نرگس (خوسف و طبس) در استان خراسان جنوبی، مجموعا ۵۰ نمونه از علائم متفاوت لکه‌برگی جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق ۲۰ جدایه قارچی از بافت‌های برگی گیاهان دارای علایم لکه برگی جداسازی‌گردید. علائم بیماری لکه برگی گل نرگس در مناطق نمونه‌برداری شده شامل لکه‌های کشیده، بیضوی، دایره‌ای قرمز تا قهوه‌ای روی برگ بود که در مواردی برگ‌ها از محل لکه دچار تاخوردگی شده و کاملا زرد شده بودند (شکل ۱).

بر اساس صفات ریخت‌شناسی و خصوصی مولکولی سه آرایه قارچی در این بررسی در ارتباط با بیماری لکه برگی نرگس در استان خراسان جنوبی شناسایی گردید (جدول ۲).

خصوصیات گونه *Phoma narcissi*

مشخصات ظاهری قارچ روی محیط کشت PDA: میزان رشد این گونه روی محیط PDA نسبتا سریع بوده و میانگین سرعت رشد بعد از ۷ روز ۶/۶ سانتی‌متر روی محیط PDA و ۸ سانتی‌متر روی محیط OA بود. پرگنه‌ها از سطح رویی محیط PDA و OA تیره و از پشت پتری‌دیش خاکستری تیره با حاشیه سیاه رنگ است. میسلیوم هوایی به صورت متراکم، کرکی یا پشم مانند است و به رنگ‌های سفید، سبز مایل به خاکستری و دودی خاکستری رنگ مشاهده گردید. در این گونه بعد از ۷ روز پیکنید به فراوانی مشاهده شد. پیکنیدها (۵۰–)۳۵ × (۱۷/۴۵–)۱۱/۲۵، تیره، منفرد و به تعداد زیاد در محیط کشت PDA تولید شد. پیکندیوسپورها شفاف، اکثرا تک سلولی (4-3*7-5) در مواردی دو سلولی (5.8 * 15-11.5)، گرد تا بیضی شکل و خمیده بودند. کلامیدوسپورها ۸–۱۵ میکرومتر، قهوه‌ای تیره، یک و چندسلولی به صورت بین سلولی و به ندرت انتهایی مشاهده شد (شکل ۲). با توجه به صفات ریخت‌شناسی و بر اساس توصیف بورما (Borema, 1993). این جدایه‌ها به عنوان گونه *Phoma narcissi* شناسایی شد.

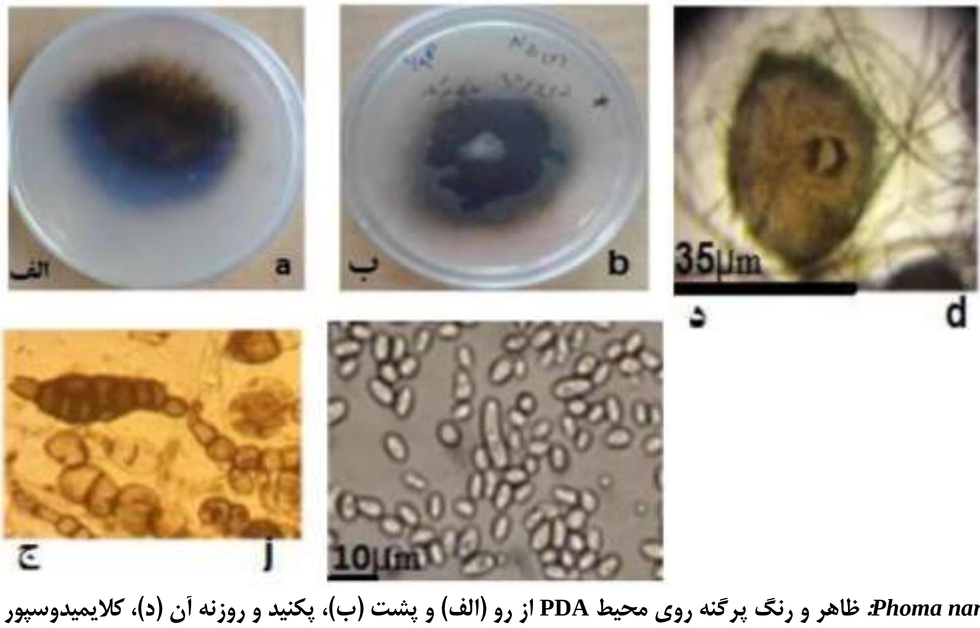
بلاست توالی ناحیه ژنی *ITS* با آغازگرهای عمومی ITS4 و ITS5 (ثبت شده در ژن بانک با رس شماره MN829259) نشان داد که توالی مربوط به جدایه *Phoma narcissi* در این مطالعه با جدایه‌های گونه تیپ (heterotypic synonym: *Phoma narcissi*) *Didymella curtisii*، *Phoma narcissi* و *Phoma* sp. با کدهای دسترسی KX379489، FJ427041 و KR909397 به‌ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰ و ۹۹ درصد همولوژی دارد. بر اساس نتایج تجزیه تبار شناختی داده‌های توالی‌های ITS، توالی نمونه مربوط به این تحقیق در کنار نمونه MF380775 *Didymella glomerata* به صورت متمایز, درون یک کلاد با حمایت بوت استرپ ۹۸ درصد همجوار با دودمانی مجزا شامل نمونه FJ427038 *Didymella curtisii* با حمایت بوت استرپ ۷۸ درصد قرار گرفت (شکل ۳). بررسی‌های تکمیلی مبتنی بر تجزیه چند ژنی و دامنه میزبانی جهت تعیین حدود و ثغور نمونه پیشنهاد می‌گردد.

1- Internal transcribed spacer
2- Maximum likelihood



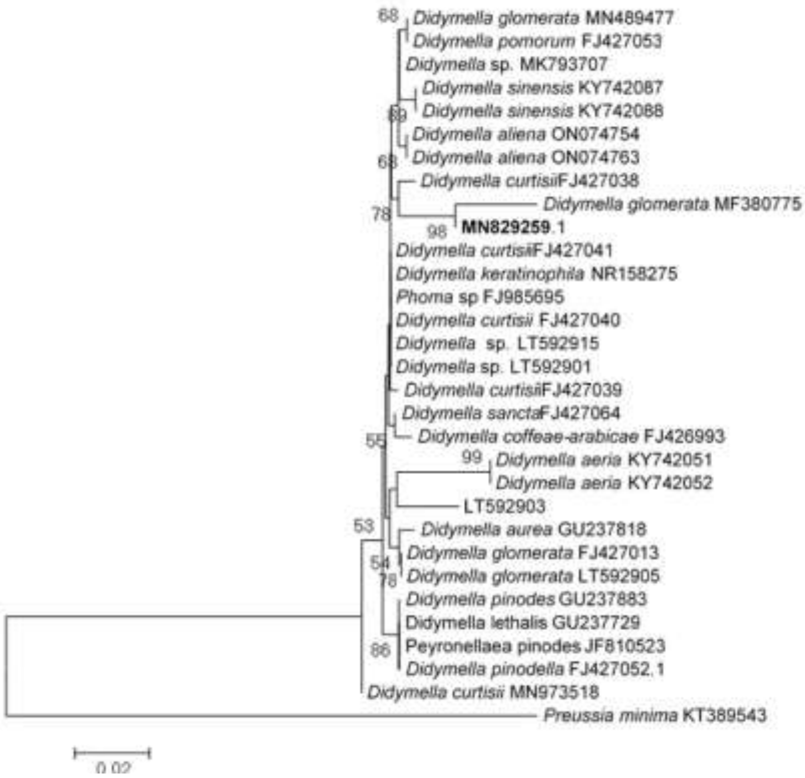
شکل ۱- علایم بیماری لکه برگی گل نرگس در مزارع استان خراسان جنوبی

Figure 1- Symptoms of Narcissus leaf spot disease in farms of Southern Khorasan province



شکل ۲- *Phoma narcissi*: ظاهر و رنگ پرگنه روی محیط PDA از رو (الف) و پشت (ب)، پکنید و روزنه آن (د)، کلایمیدوسپور زنجیره‌ای تک سلولی و چندسلولی (ج) پیکنیدیوسپور(ت)

Figure 2- *Phoma narcissi:* Appearance and color of the colony on the PDA medium from (a) and back (b), pycnidium ostiol (d), chlamydospore single-celled and multicellular chains (j) pycnidiospore (t)



شکل ۳- درخت درخت فیلوژنتیکی جدایه *Phoma narcissi* بر اساس هم ردیفی توالی ناحیه ITS با توالی گونه‌های موجود در بانک ژن به روش بیشینه درست نمایی

اعداد روی محل انشعاب شاخه‌ها نشان دهنده‌ی درصد مقادیر بوت استراپ با ۱۰۰۰ تکرار است.

Figure 3- Phylogenetic identification of *Phoma narcissi* based on ITS sequence and calculated by the maximum likelihood method

The values on the phylogenetic tree are bootstrap values, which is the percentage calculated from 1000 replicates in a bootstrap analysis.

جدول ۲- آرایه های قارچی عامل و همراه بیماری لکه برگی گل نرگس در خراسان جنوبی

Table 2- Fungal isolate of casual and associated with narcissus leaf spot disease in South Khorasan

آرایه قارچی **Fungus isolate**	شماره دسترسی **Accession number**	نتایج بلاست توالی **Sequence Blast result**	فراوانی **Frequency(%)**	بیماری‌زایی **Pathogenicity**
Phoma narcissi	MN829259	*Phoma narcissi* (100%) FJ427041	65	+
Cladosporium herbarum	MN611101	*Cladosporium herbarum* (100%) MK433619	17	–
Fusarium sp.	MN595065	*Fusarium* sp. (100%) KR909397	18	–

در آزمون اثبات بیماری‌زایی ۷ روز بعد از تلقیح عامل بیماری به گیاهان نرگس سالم، علایم به صورت لکه‌های گرد قهوه‌ای ظاهر شده و به تدریج از محل لکه به سمت نوک برگ نوار زرد رنگی گسترش پیدا کرد و مشابه با علایم مزرعه در آزمون‌های بیماری‌زایی با گذشت زمان برگ‌ها از محل لکه تاخورده و زرد شدند. علایم مشاهده شده در آزمون بیماری‌زایی، با علایم بیماری در مزرعه کاملا مطابقت داشت (شکل ۴).



شکل ٤- مراحل انجام آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های *Phoma narcissi* از سمت چپ به‌ترتیب گیاه سالم- تلقیح برگ با میسیلیوم قارچ و وقوع علایم ۷ روز بعد از تلقیح در پلات آزمایشی مزرعه

Figure 4- Steps of the pathogenicity of *Phoma narcissi* isolates from the left, respectively, of a healthy plant - leaf inoculation with fungal mycelium and the occurrence of symptoms 7 days after inoculation

گونه‌های آنامورفیک جنس *Phoma* spp. در دامنه وسیعی از نیچ های اکولوژیکی یافت می‌شوند. گونه‌های این جنس قارچی به عنوان عامل بیمارگر در میزبان‌های مختلف گیاهی گزارش شده‌اند. در جهان گونه *Ph. narcissi* از گیاهان گل نرین (*Nerine* sp.)، *Ismene* sp. و گل آماریلیس (*Hippeastrum* sp.) که همگی از تیره Amaryllidaceae اند گزارش شده است (Aveskamp *et al.*, 2009). در ایران گونه *Stagonospora curtisii* که در منابع همنام با گونه *Phoma narcissi* است، بر اساس خصوصیات مرفولوژیک از مزارع نرگس بهبهان به‌عنوان عامل لکه برگی گزارش شده است (Mohammadi *et al.*, 2004). جدایه مورد بررسی در مطالعه محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2004) روی محیط کشت هیچ‌گونه پیکنیدیوم تولید نکرده است اما در جدایه‌های این بررسی روی محیط کشت PDA، پیکنیدیوم‌های فراوان بعد از هفت روز ظاهر شد. بررسی جدایه‌های مختلف گونه *Peyronellaea curtisii* که در منابع همنام آنامورفیک *Ph. narcissi* است نشان دادند که جدایه‌ها در تشکیل و یا عدم تشکیل پکنیدیوم روی محیط کشت با هم تفاوت دارند (Hrynkiewic *et al.*, 2015). خصوصیات مولکولی جدایه عامل لکه برگی نرگس در ایران که در این مطالعه انجام گرفت، نشان داد گونه عامل لکه برگی نرگس در ایران با سایر جدایه‌های بیمارگر این قارچ روی جنس‌های دیگر خانواده زنبقیان در یک خوشه واحد قرار می‌گیرد. در این بررسی آرایه‌های قارچی *Cladosporium* sp. و *Fusarium* sp. به‌عنوان عوامل همراه بیماری با فراوانی ۱۷ و ۱۸ درصد گزارش می‌شوند. بر اساس دانش ما، عامل اصلی بیماری لکه برگی در مزارع نرگس شرق کشور قارچ *Ph. narcissi* است و آرایه‌های *Cladosporium* sp. و *Fusarium* sp. نیز به‌عنوان عوامل قارچی همراه با بیماری گزارش می‌شوند. از آنجایی که شناسایی عامل بیماری در انتخاب روش‌های موثر و کارآمد در مدیریت بیماری موثر است، نتایج این بررسی می‌تواند در مدیریت بیماری در منطقه مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول ارائه شده به دانشگاه بیرجند است و بدین‌وسیله از مدیریت محترم دانشگاه بیرجند بابت حمایت مالی و از ریاست محترم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان جنوبی به جهت استفاده از امکانات آزمایشگاهی آن مجموعه قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Agricultural jihad of southern Khorasan. (2019). Agricultural information of crops in southern Khorasan province. Information website: https://www. https://kj-agrijahad.ir

2. Alhussaini, M., Moslem, M., Alghonaim, M., Al-Ghanayem, A., & Hefny, H. (2015). Biodiversity and distribution of airborne *Cladosporium* species in Riyadh city. *Journal of American Science*, *11*(7), 145-154.
3. Aveskamp, M.M., Gerard, J.M., Verkley, J., Mónica, A., & Murace, A. (2009). DNA phylogeny reveals polyphyly of Phoma section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties, *Mycologia*, *101*(3), 363-382. https://doi.org/10.3852/08-199
4. Borema, G.H. (1993). Contribution towards a monograph of phoma coelomycetes. *Persoonia*, *15*, 197-221.
5. Hanks, G.R., & Chastagner, G.A. (2018). *Diseases of Daffodil* (*Narcissus*). In: McGovern R, Elmer W. (eds) Handbook of Florists' Crops Diseases. Handbook of Plant Disease Management. Springer, Cham.
6. Hrynkiewicz, K., Deka, P., Ruszkiewicz-Michalska, M., Thiem, D., & Szmidt-Jaworska, A. (2016). Interactive physiological potential of *Peyronellaea curtisii* (=*Phoma narcissi*) strains for enzymatic attack and defense capabilities against phytoalexins. *Eurpean Journal of Plant Pathology*, *145*, 89–102 https://doi.org/10.1007/s10658-015-0817-2
7. Mohammadi, H., Minasian, V., & Moosavi-jorf, S.A. (2004). *Occurrence of Narcissus leaf spot in Iran*. Proceeding of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Iran, pp: 460.
8. Taylor, A., Armitage, A.D., Handy, C., Jackson, A.C., Hulin, M.T., Harrison, R.J., & Clarkson, J.P. (2019). Basal rot of *Narcissus*: understanding pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi*. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2905. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02905